

Bestimmung von glykolytischen Enzymen
in der Cornea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Rita Maier
aus Marburg a. d. Lahn

Marburg 1968

Bestimmung von glykolytischen Enzymen in der Cornea

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Rita Maier

aus Marburg a. d. Lahn

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 29. Jan. 1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof.Dr.med. R. Siegert
Referent: Doz.Dr.med. M.Reim
Correferent: Prof.Dr.med. W.Straub

I n n h a l t

	Seite
<u>I. Einführung</u>	1
A. Vorwort	
B. Bisherige Kenntnisse vom Aufbau und Stoffwechsel der Cornea.	
1. Anatomischer Aufbau	
a. Epithel	1
b. Endothel	3
c. Stroma	3
2. Über die Proteinbestandteile der Cornea.	4
3. Stoffwechselwege in der Cornea	5
4. Aus der Literatur über Enzymaktivitäten in der Cornea.	
<u>II. Fragestellung und Plan der eigenen Untersuchungen</u>	6
<u>III. Methoden</u>	7
A. Gewinnung des Gewebes	
1. Schweineaugen	
2. Kaninchenaugen	
3. Menschaugen	8
B. Präparation und Extraktion des Epithels und des Endothels.	8
1. Präparation des Epithels	
2. Präparation des Endothels	9
3. Extraktion des Epithels	
4. Extraktion des Endothels	10
C. Modifikationen der Extraktionsbedingungen	
1. Homogenisieren mit dem Ultraturrax	
2. Gewinnung des Gesamthomogenates	11
D. Behandlung von Tieren mit Ultracortenol	
E. Kinetische Untersuchungen	12
1. Bestimmung der Substratoptima	
2. Bestimmung der Michaelis-Konstanten	

3. Vergleich der Größen der Michaelis-Konstanten im Epithel mit denjenigen im Endothel	13
F. Der Proteingehalt der Extrakte	14
1. Die einfache Bestimmung der extrahierbaren Proteine	
2. Bestimmung der extrahierbaren Proteine nach TCA-Fällung	15
3. Diskussion der Ergebnisse der Proteinbestimmung	
G. Ausführung der Messungen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten	16
H. Auswertung der Messungen	17
<u>IV. Ergebnisse und Besprechung</u>	18
A. Bestimmung von glykolytischen Enzymen im Epithel und Endothel der Cornea des Schweines und Kaninchens sowie im menschlichen Corneaepithel	
B. Vergleich zwischen Epithel und Endothel der Cornea bei verschiedenen Spezies	21
1. Schweinecornea	
2. Kaninchencornea	24
C. Enzymaktivitäten der Glykolyse im Corneaepithel des Menschen	26
D. Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel der Cornea verschiedener Spezies.	28
E. Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Endothel der Cornea von Schweinen und Kaninchen	31
F. Beziehung zwischen Enzymaktivität und Corticosteroiden	33
G. Relationen der Enzymaktivitäten zueinander	
<u>V. Schlußbetrachtung</u>	36

VI. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Abkürzungen

Enzymbestimmungen

Methodischer Anhang: Tabellen der Einzelwerte



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINFÜHRUNG

A. Vorwort

=====

"Die Enzymologie gehört den jungen Wissenschaften an. Ihr Anspruch ist groß, doch ihr Besitzstand ist gering. Der hohe Anspruch leitet sich her von der Nähe zu den Wurzeln der lebendigen Organisation; der geringe Stand der Erkenntnis beruht auf methodischen Schwierigkeiten" (PETTE).

B. Bisherige Kenntnisse vom Aufbau und Stoffwechsel

=====

der Cornea

=====

Unsere heutige Vorstellung von dem anatomischen Aufbau der Hornhaut, die chemische Zusammensetzung ihrer Bausteine und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, sowie über die Stoffwechselvorgänge in ihren einzelnen Schichten resultiert aus den verschiedenen Darstellungen, die auf diesem Gebiete erschienen sind (DAVSON, 1962; DUKE - ELDER und PERKINS, 1960; PIRIE und VAN HEYNINGEN, 1956; ROHEN, 1964).

1. Anatomischer Aufbau der Hornhaut

Die Hornhaut baut sich histologisch aus drei Schichten auf, welche eine funktionelle Einheit bilden. Diese sind: Epithel, Stroma und Endothel.

a. Epithel

Das Epithel stellt histologisch ein nicht verhornendes Plattenepithel dar. Es wird bei Pferd und Rind von über 10 übereinander liegenden Epithellagen gebildet. Beim Menschen, Schwein und Kaninchen baut sie sich aus 5-8 Zellschichten auf. Die einzelnen Schichten des Hornhautepithels werden von Zellen dargestellt, die eine jeweils

besondere und für die betreffende Schicht charakteristische Form zeigen. So findet man die flachen Deckzellen, die mehr rundlichen intermediären Zellen und die kubischen z.T. zylindrischen Basalzellen. Die Epithelzellen sind durch Interzellulärbrücken, sog. Desmosomen, auf ihrer Unterlage, der Basalmembran auf dem Hornhautstroma und auch untereinander befestigt. Die Grenzschicht zur Außenwelt wird von den flachen Deckzellen verkörpert. Darunter befindet sich die Schicht der mehr rundlichen intermediären Zellen. Schließlich folgen die dem Hornhautstroma aufsitzenden kubischen bis zylindrischen Basalzellen, deren Cytoplasma sich stärker anfärben läßt als das der Deckzellen und deren Zellkerne stärker strukturiert und kontrastreicher sind (ROHEN, VIRCHOW). Elektronenmikroskopisch lassen sich im Cytoplasma dieser Zellen gut ausgebildete Zellorganellen erkennen. Vor allem in der Nähe der Zellkerne befinden sich reich gegliederte, kleine Mitochondrien. Der Golgi-Apparat ist gut ausgebildet, die Zellkerne enthalten viele Nukleoproteidpartikel, der ganze Zelleib wird weitgehend von endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen erfüllt. In den Intermediärzellen findet man entsprechend ihrer Lage die für die Basalzellen typischen Organellen sowie die für die Deckzellen charakteristischen Tonofibrillen. Die Mitochondrien zeigen hier aber bereits Degenerationserscheinungen in Form von Einrissen in der Membran, Auflösung der Cristae und intramitochondriale Vakuolen (JAKUS, RHODIN).

Das Cytoplasma der Deckzellen ist weitgehend "leer". Sie zeichnen sich aus durch ihren Reichtum an Tonofibrillen. Mitochondrien und der Golgi-Apparat fehlen. Es sind nur spärliche Reste des endoplasmatischen Retikulums erhalten geblieben.

Histochemisch zeichnen sich alle Schichten des Epithels durch einen reichen Gehalt an Glykogen aus (ROHEN; GALMETTES und Mitarbeiter). In den Deckzellen wurden von ROHEN perijodsäurereaktive Glykoproteide gefunden, die wohl den Tonofibrillen zuzuordnen sind. In den basalen Zell-

schichten konnte er reichlich Phosphatasen nachweisen. PENA-CARILLO bestimmte hier einen hohen Gehalt der Cytochromoxydase. Desoxyribonucleinsäuren finden sich gleichmäßig in den Zellkernen aller Epithelzellen (CALMETTES), dagegen sind die Ribonucleinsäuren unterschiedlich im Hornhautepithel verteilt. So ließen sich RNS-Partikel bei Mensch und Kaninchen nur in den Basalzellen nachweisen, bei Pferd und Rind dagegen auch in den Intermediärzellen.

Epitheldefekte werden durch Dehnung der benachbarten Zellen (MAURICE) und durch Regeneration einer zunächst einzelligen Epitheldecke (PEDLER) überbrückt. In diesen Zellen finden sich reichlich Zellorganellen vor allem Mitochondrien, die größer und stärker gegliedert sind.

b. Endothel

Das Endothel wird von einer einzelligen Schicht aufgebaut. Elektronenmikroskopisch lassen sich in ihm zahlreiche Mitochondrien erkennen, sowie ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum (KAYE, JAKUS, TENG, PEDLER). Das Endothel stellt eine biologische Grenzschicht dar und verdient daher besondere Beachtung. Durch das Endothel können zahlreiche Substanzen (MAURICE) und kolloidale Partikel (KAYE und PAPPAS) in die Hornhaut aufgenommen werden. Es wird häufig mit dem Endothel der Blutgefäße verglichen.

c. Stroma

Das Stroma ist dem Bindegewebe sehr ähnlich und 8-12mal so dick wie das Epithel. Der Hauptanteil am Aufbau des Stromas wird von den Stromalamellen gebildet, zwischen denen die langgestreckten, flachen Stromazellen liegen, die eine große Ähnlichkeit mit den Fibrocyten haben (VIRCHOW, ROHEN). Das Cytoplasma dieser Zellen ist wenig differenziert. Ihre Ausläufer zeigen elektronenmikrosko-

pisch keine scharfen Grenzen zur Interzellulärsubstanz (PEDLER, KAYE und PAPPAS). Daher nimmt man an, daß die Stromalamellen von den Stromazellen synthetisiert und regeneriert werden (JAKUS, SCHWARZ). Dafür sprechen auch Versuche von DELBRÜCK, der in isolierten Stromascheibchen in vitro den Einbau von anorganischem ^{35}S in die Mucopolysaccharide nachweisen konnte.

PRAUS und OBENBERGER fanden, daß der Einbau von ^{35}S in die Mucopolysaccharide des Stromas in vitro aber wesentlich schneller vonstatten ging, wenn eine vollständige Epitheldecke vorhanden war. Dieser Befund spricht dafür, daß das Epithel auch an der Synthese der Interzellulärsubstanz beteiligt zu sein scheint.

Ferner findet man im Stroma eine seltener vorkommende Zellform, die wie flachgedrückte Leukocyten aussieht und reich an Zellorganellen ist.

2. Über die Proteinbestandteile der Cornea

Neben dem strukturbildenden, im Wasser unlöslichen Kollagen, das den Hauptanteil der Grundsubstanz des Stromas ausmacht, finden sich vor allem im Epithel und Endothel der Hornhaut reichlich lösliche Proteine. KAWERAU und OTT konnten im Epithel 4-5 Proteinfraktionen elektrophoretisch auftrennen, deren relativer Anteil verschieden ist. FRANCOIS und RABAEY gelang es mit Hilfe der Immunelektrophorese im Hornhautepithel zahlreicher Spezies eine große organspezifische Proteinfraktion abzutrennen.

Ein großer Teil der löslichen Proteine stellt Enzyme dar, die Katalysatoren der Stoffwechselreaktionen im Organismus. Durch die Bestimmung der Aktivitäten dieser Enzyme kann man auf die hier ausgebildeten Reaktionswege des Stoffwechsels rückschließen. Schließlich erlaubt die Darstellung der Relationen der einzelnen Enzymaktivitäten in Form eines Enzymverteilungsmusters (DELBRÜCK, ZEBE, BÜCHER; PETTE und BÜCHER), etwas über die Stoffwechsel-

eigenschaften der Zelle auszusagen. Von großer Wichtigkeit sind hier die Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels, da ihre Funktion die Bildung von chemischer Energie ist.

Außer den hochmolekularen Stoffen befinden sich in der Hornhaut natürlich zahlreiche niedermolekulare Substanzen (Metabolite), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

3. Stoffwechselwege in der Cornea

Nach den bisherigen Kenntnissen, die meisten aus Bilanzstudien, sind in der Hornhaut folgende Stoffwechselwege vorhanden: Glykolyse, Zitronensäurecyclus und der Hexosephosphat-Shunt. Die hohen Werte, die von LANGHAM bei der Messung von Atmung und Glykolyse im Epithel und Endothel der Kaninchenhornhaut gefunden wurden, sprechen für einen intensiven Stoffwechsel in den Grenzschichten der Hornhaut.

4. Aus der Literatur über Enzymaktivitäten in der Cornea

Von KINOSHITA und MASURAT wurden im Hornhautepithel des Rindes die Aktivitäten von 6-PGDH^{*)} und G-6-PDH ermittelt, die Katalysatoren der ersten Reaktionsschritte des Hexosephosphat-Shunts. KUHLMAN und RESNIK bestimmten die Aktivitäten der LDH, ALD, HK, IDH und des ZF im Epithel und Stroma der Rattenhornhaut. Ferner wurden von KUHLMAN die Aktivitäten von LDH, ALD, HK, MDH, IDH, G-6-PDH und GSSGDH im Epithel von Katzen, Ratten und Kaninchen bestimmt. TESTA ermittelte die Aktivitäten von GOT und GPT. Von DELBRÜCK wurden die Aktivitäten von 15 Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Epithel und Stroma der Rinderhornhaut bestimmt. Er war damit der erste, der eine Beziehung der einzelnen Enzyme zueinander in Form des Enzymverteilungsmusters zeigte. Von ihm wurden folgende

*) Ein Verzeichnis der Abkürzungen findet sich am Ende der Arbeit.

Enzyme gemessen: LDH, GDH, ALD, GAPDH, PGK, PK, IDH, MDH, GOT, GPT, GLDH, G-6-PDH, 6-PGDH und HK. DELBRÜCK fand einen extrem hohen Wert für die IDH im Rinderhornhaut-epithel. REIM stellte Enzymverteilungsmuster für das Epithel und Stroma der Kaninchen- und Rinderhornhaut sowie für das menschliche Epithel auf. Er fand im Kaninchenhornhautepithel eine besonders hohe Aktivität der LDH, wie schon KUHLMAN 1957.

II. FRAGESTELLUNG UND PLAN DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

Die in den vorangegangenen Abschnitten aufgezeigten Kenntnisse über den Aufbau der Hornhaut, ihren Stoffwechsel sowie dessen Bedeutung für die Hornhaut lassen erkennen, daß unsere Vorstellungen noch lückenhaft sind. Dies gab Anlaß zur Untersuchung von Hornhäuten anderer Spezies. Es interessierte vor allem die Bestimmung von Enzymaktivitäten im Epithel und Endothel der Schweinehornhaut, da in diesen Geweben nach Durchsicht der Literatur noch keine Enzymaktivitäten gemessen worden sind, und für das Endothel überhaupt noch keine Angaben vorliegen. Dem Endothel wurde die größere Bedeutung zugemessen, da seine Rolle für die Funktion der Hornhaut noch weitgehend unklar ist.

Ferner wurden glykolytische Enzyme im Endothel der Kaninchenhornhaut gemessen und um einen Vergleich zu haben, erfolgte die Bestimmung dieser Enzyme auch im Epithel der Kaninchenhornhaut.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung von menschlichen Hornhäuten. Es wurden hier wieder Enzyme der Glykolyse gemessen. Die Untersuchung mußte aber, da nur immer geringe Gewebsmengen zur Verfügung standen, auf das Epithel beschränkt bleiben, so daß hier kein Vergleich zwischen Epithel und Endothel durchgeführt werden konnte.

Durch Gegenüberstellung der Enzymaktivitäten im Epithel und im Endothel verschiedener Tiere sollte die Frage beantwortet werden, ob Speziesunterschiede bestehen und welcher Tierart die menschliche Hornhaut ähnlich ist.

Gemessen wurden die Aktivitäten folgender Enzyme:
LDH, GDH, ALD, TIM, GAPDH, PGK, PK, GPM, F-6-PK, HK und GLDH.

III. METHODEN

A. Gewinnung des Gewebes

=====

1. Schweineaugen

Die zu den Versuchen verwandten Schweineaugen wurden von Schlachttieren des Marburger Schlachthofes ^{*)} gewonnen. Die Augen wurden in unserer Gegenwart unmittelbar post mortem schonend enucleiert. Wir legten sie sofort auf Eis und brachten sie möglichst schnell in das Laboratorium, wo sogleich die Präparation begann. Bei Augen, welche zur Untersuchung des Epithels verwandt wurden, wurde sehr darauf geachtet, daß das Epithel nicht mit dem Eis in unmittelbare Berührung trat, um Kälteagglutinationen zu vermeiden.

2. Kaninchenaugen

Ferner dienten als Versuchstiere Kaninchen eines in Marburg gezüchteten Wildstammes. Die Tiere wurden in einem offenen Stall gehalten und mit ALTROMIN-Kaninchenfutter ernährt. Sie hatten ein Körpergewicht von 3-4 kg. Die Tötung der Tiere erfolgte mit 0,5 g Evipan i.v. und anschließender Luftembolie. Die Enukleation wurde unter sorgfältiger Schonung des Hornhautepithels durchgeführt.

*)Herrn Dr. Dr. Wandt und seinen Mitarbeitern sei für ihre stets freundliche Hilfe sehr gedankt.

3. Menschaugen

Das Hornhautepithel von menschlichen Augen erhielten wir von Patienten der Marburger Universitäts-Augenklinik, bei denen aus therapeutischer Indikation eine Enukleation vorgenommen werden mußte. Zum Teil wurde dabei das Epithelgewebe der Hornhaut durch Abrasio mit Hilfe eines Starmessers unmittelbar vor der Operation gewonnen. Die Untersuchung des menschlichen Hornhautepithels erfolgte an 13 Gewebsextrakten, wobei es sich um 10 normale und 3 pathologische Epithelien handelte. Von diesen pathologischen Epithelien zeigte eines eine bandförmige Degeneration, ein weiteres Epithel stammte von einer Patientin mit rezidivierenden Epithelerosionen in Abhängigkeit vom Zyklus, wobei die Erosionen zum Zeitpunkt der Menstruation auftraten. Das dritte pathologische Epithel war chronisch oedematös bei sekundärem Glaukom.

B. Präparation und Extraktion des Epithels und Endothels

1. Präparation des Epithels

Zur Gewinnung des Epithels wurden die Augen zunächst vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe einer Spritzflasche von der Seite abgespült. Das Epithel wurde auf diese Weise von Blut und Sekret befreit. Dann wurde das Epithel unter leichtem Druck mit einem feinen Starmesser abgekratzt, wobei von der Peripherie auf das Zentrum hin gearbeitet wurde. Dabei wurde sehr sorgfältig darauf geachtet, daß die Bowmansche Membran nicht verletzt wurde, um kein Stromagewebe mitzunehmen. Das so gewonnene Gewebe wurde feucht in einem Glas - in - Glas Potter - Elvehjem - Homogenisator gewogen. In Tab. 1 sind die durchschnittlichen Gewichte der verschiedenen Gewebe, die

im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, Vergleichswerten aus der Literatur gegenübergestellt. Die Einwaage von 4 Schweineepithelien betrug im Mittel 60 mg.

Tab. 1

Feuchtgewichte von Epithelien verschiedener Spezies in mg mit Vergleichswerten aus der Literatur. $M_{S_M}^T$
n = Zahl der Untersuchungen

Kaninchen	diese Arbeit	REIM	FRENCH u. DUMA
Epithel	7,31+2,2 n= 11	5,45 0,27 n= 25	5,65
Endothel	2,5 +0,215 n= 15		3,35
<u>Schwein</u>			
Epithel	14,9+4,3 n= 47	13,5 n= 1	
Endothel	3,39+0,74 n= 193		
<u>Mensch</u>			
Epithel	3,43+0,6 n= 6		

2. Präparation des Endothels

Zur Gewinnung des Endothels wurden Sclera und Conjunktiva circular unter Stehenlassen eines circa 2 mm breiten Streifens um die Cornea durchschnitten. Dann wurden mit einer feinen Pinzette die Iris, der Ciliarkörper und die Linse von der Hinterwand der Hornhaut abgezogen. Mit dem stumpfen Pol eines Hockeymessers wurde schließlich das Endothel unter sorgfältiger Schonung der Descemetischen Membran abgekratzt, auf ein Starmesser übertragen und am Stempel des Potter-Homogenisators abgestreift. Das Gewebematerial für Endotheluntersuchungen wurde im Durchschnitt von 9 Schweineaugen gewonnen. Die Einwaage betrug im Mittel 30 mg.

3. Extraktion des Epithels

Nach der Bestimmung des Gewichtes des Epithelgewebes wurde es sofort mit m/15 K-Phosphatpuffer pH 7,3 versetzt

und unter ständigem Abkühlen 4 x 15'' lang homogenisiert. Das hierdurch gewonnene Homogenat wurde in der gekühlten Ultrazentrifuge "Omikron" von Fa. Christ 25 Minuten lang bei 20.000 U / Min. zentrifugiert. Das Zentrifugat stellte den Extrakt dar, der für die Enzymbestimmungen verwandt wurde. Das Extraktvolumen betrug im Mittel 3 ml.

4. Extraktion des Endothels

Als Extraktionsmedium wurde beim Endothel wie beim Epithel eiskalter m/15 K-Phosphatpuffer pH 7,3 verwandt. Die Homogenisierung erfolgte ebenfalls unter laufender Kühlung in einem Glas - in - Glas Potter-Homogenisator 4 x 15 '' lang. Zentrifugiert wurde wieder in der Ultrazentrifuge von Christ 25 Minuten lang bei 20.000 U / Min. Das Extraktvolumen betrug im Mittel 3 ml.

C. Modifikationen der Extraktionsbedingungen

1. Homogenisieren mit dem Ultraturrax

Um eine noch stärkere und feinere Aufspaltung der Partikel zu erreichen, wurde anstelle des Homogenisators nach Potter der Ultraturrax-Homogenisator zur Gewinnung der Homogenate verwandt. Es wurde 8 x 15'' lang homogenisiert, wobei der Ultraturrax-Homogenisator langsam von niedrigsten Touren bis auf seine höchste Drehzahl geschaltet wurde (24.000 U/Min.). Die sich anschließende Enzymbestimmung ließ jedoch keine nennenswerte Änderung der Aktivitätsgrößen erkennen. Es war lediglich die Aktivität der LDH leicht erhöht, dagegen war die F-6-PK überhaupt nicht nachweisbar.

2. Gewinnung des Gesamthomogenates

Zur Gewinnung eines Gesamthomogenates wurde das Endothel zunächst 6 x 30'' lang im Glas - in - Glas Potter unter sorgfältiger Kühlung homogenisiert. Anschließend wurde das gewonnene Homogenat in der Christ-Universal-Junior III-Zentrifuge bei 500 U/Min. zentrifugiert. Der hierdurch erhaltene Überstand wurde aufbewahrt, das Sediment mit m/15 K-Phosphatpuffer pH 7,3 versetzt und noch einmal im Glas - in - Glas Potter 4 x 30'' homogenisiert, wieder zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden nun vereinigt und stellten den zu testenden Extrakt dar. Die hier bestimmten Aktivitäten fielen nicht viel anders aus als in den stärker zentrifugierten Extrakten.

D. Behandlung von Tieren mit Ultracortenol *)

Es interessierte die Frage, ob eine Wechselbeziehung zwischen der Applikation von Steroiden und der Größe der Enzymaktivitäten besteht. Zu diesem Zwecke wurden einigen Kaninchen tagsüber stündlich Ultracortenoltropfen in die Augen gegeben. Für die Nacht gab man den Tieren Ultracortenol in Salbenform in den Konjunktivalsack. Zwei Versuchstiere wurden 8 Tage mit Ultracortenol behandelt, zwei weitere Kaninchen wurden 16 Tage lang getropft. Die Tötung der Tiere, Enukleation und die sich anschließende Herstellung des Extraktes erfolgte in gewohnter Weise.

*) Prednisolontrimethylacetat der Fa. Ciba
(Salbe 0,5 %ig, Tropfen 0,3 %ig)

E. Kinetische Untersuchungen

1. Bestimmung der Substratoptima

Den Enzymaktivitätsbestimmungen wurden kinetische Untersuchungen vorausgeschickt, um zu prüfen, ob die von BÜCHER, LUH und PETTE vorgeschlagenen Substratoptima auch Gültigkeit für das in dieser Arbeit untersuchte Gewebsmaterial hatten. Es sollte auf diese Weise vermieden werden, daß bei einer zu niedrigen Substratkonzentration bzw. im Bereich der Substrathemmung getestet wurde. Es wurde daher für jedes Enzym der Bereich seines Substratoptimums bestimmt, indem in einer Serie die Größe des Extraktvolumens in jedem Test konstant gehalten und die Substratkonzentration variiert wurde. Die so ermittelten Werte wurden für die jeweilige Testserie in einem Koordinatensystem eingetragen, wobei auf der Ordinate die Enzymaktivität in internationalen Einheiten (IE) und auf der Abszisse die Substratkonzentration in mM aufgetragen wurde. Die hierdurch gewonnenen Ergebnisse stellten die typische logarithmische Kurve dar, die zunächst relativ steil anstieg und dann annähernd parallel zur Abszisse verlief. Das Substratoptimum ließ sich dann durch Fällung eines Lotes vom ersten parallelen Teil der Kurve schätzen.

Der Vergleich der experimentell ermittelten Substratoptima mit denjenigen, die in den Testvorschriften angegeben waren, zeigte, daß eine gute Übereinstimmung bestand.

2. Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten wurde in einem Koordinatensystem auf der Abszisse $\frac{1}{S} \left[\frac{1}{\text{mM}} \right]$ und auf der Ordinate $\frac{1}{v} \left[\frac{1}{\text{IE}} \right]$ nach LINEWEAVER und BURCK aufgetragen. Die Verbindung der einzelnen Punkte ergab eine Gerade. Aus der Größe des Schnittpunktes dieser Geraden mit der Abszisse ließ sich die Michaelis-Konstante berechnen. In

Abb. 1 ist das graphische Verfahren für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten der PK dargestellt.

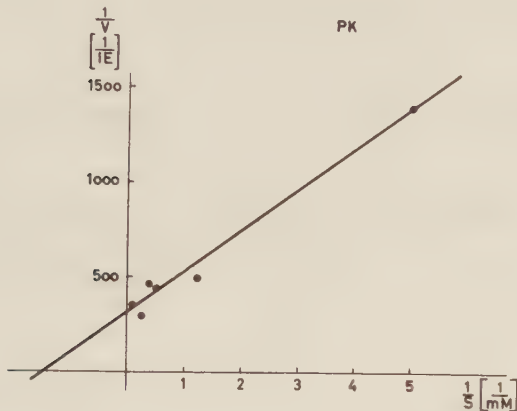


Abb. 1

Graphische Darstellung von $\frac{1}{S}$ und $\frac{1}{v}$ zur Berechnung der Michaelis-Konstanten K_m der PK für PEP-C im Schweinehornhautendothel.

3. Vergleich der Größen der Michaelis-Konstanten im Epithel mit denjenigen im Endothel

In Tab. 2 sind die ermittelten Größen der Michaelis-Konstanten für das Epithel und Endothel der Schweinehornhaut angegeben.

Vergleicht man die im Epithel und Endothel bestimmten Michaelis-Konstanten der einzelnen Enzyme miteinander, so findet man für die LDH und die GPM etwa gleiche, für die ALD, TIM und PK unterschiedliche Werte. Die K_m für die zuletzt genannten Enzyme erwies sich im Epithel um den Faktor 3 - 4 kleiner als im Endothel. Da sich aber bei der Bestimmung der Substratoptima herausgestellt hatte,

daß der jeweilige Bereich des Substratoptimums sehr groß war, spielen die unterschiedlichen Größen der Michaelis-Konstanten im Epithel und Endothel für die Enzymbestimmungen praktisch keine Rolle, so daß die in den Testvorschriften angegebenen Substratoptima für beide Gewebe als gültig gehalten werden können.

Tab. 2

Michaelis-Konstanten im Epithel und Endothel der Schweinehornhaut

Enzym	Substrat	Epithel K_m [mM]	Endothel K_m [mM]
LDH	BTS	0,345	0,42
ALD	FDP-C	0,011	0,039
TIM	GAP	0,099	0,48
PK	PEP	0,3 +	1,0
GPM	3-PG-C	0,95 +	1,25
F-6-PK	F-6-P	0,18 +	-

+ bedeutet Hemmung bei höherer Substratkonzentration.

F. Der Proteingehalt der Extrakte

=====

1. Die Bestimmung der extrahierbaren Proteine

Proteinbestimmungen der Extrakte wurden regelmäßig vorgenommen. Es wurde die Biuret-Methode nach BEISENHERZ, BOLTZE, BÜCHER, CZOK, GARBADE, MEYER-ARENDT und PFLEIDERER angewandt, die auf Halbmikrocuvetten umgestellt wurde. Ein bestimmtes Extraktvolumen wurde mit 1,0 ml Biuret-Reagens versetzt und mit physiologischer NaCl auf 2,0 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten lang mit einem Magnetrührer

gerührt. Anschließend wurde die Extinktion im Photometer Eppendorf bei 546 m μ in einer Cuvette mit der Schichtdicke von 2 cm bestimmt.

2. Bestimmung der extrahierbaren Proteine nach TCA-Fällung

Bei der Proteinbestimmung mit zusätzlicher TCA-Fällung wurde der Gewebsextrakt zunächst mit TCA versetzt und das ausgefällte Eiweiß in der Christ-Zentrifuge Universal-Junior III bei 5 000 U/Min. abzentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde mit Biuret-Reagens und physiologischer NaCl versetzt und 30 Minuten lang mit dem Magnetrührer gerührt. Die Messung erfolgte in gleicher Weise wie bei der einfachen Biuret-Methode am Photometer Eppendorf. Die Gegenüberstellung der auf diesen zwei Wegen ermittelten Werte ergab keine auffälligen Unterschiede.

3. Diskussion der Ergebnisse der Proteinbestimmung

Das unter den beschriebenen Bedingungen aus dem Gewebe extrahierte Protein dürfte überwiegend dem cytoplasmatischen Raum der Zellen zuzuordnen sein. Der relative Anteil z.B. an mitochondrialen und nuklearen Proteinen ist sicher sehr gering.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der eigenen Proteinbestimmungen Vergleichswerten aus der Literatur gegenübergestellt. Die große Schwankungsbreite der Proteinwerte für das Endothel, die sich in einer Standardabweichung der Mittelwerte von fast 20 % offenbart, dürfte weniger auf Änderungen der Extraktionsbedingungen beruhen, als auf den geringen Mengen an Extrakt, die für die Proteinanalysen zur Verfügung standen. Meist lagen die erzielten Extinktionen nur wenig über den Blindwerten. Aus diesen Gründen sollte man die Proteinwerte für das Endothel als eine vorläufige Schätzung betrachten.

Das extrahierbare Protein ist in den Extrakten der Schweinecornea relativ niedrig. So liegen die von REIM und SCHRAMM gefundenen Werte im Epithel des Kaninchens um 50 % höher.

FRENCH und DUMA ermittelten mit der Mikrokjeldahl-Methode für das gesamte mit TCA fällbare Protein des Kaninchenhornhautepithels natürlich noch höhere Werte. Mit FRENCH und DUMA übereinstimmend kann jedoch gesagt werden, daß das extrahierbare Protein aus dem Epithel mindestens zweimal so hoch liegt wie das aus dem Endothel.

Tab. 3

Ergebnis der eigenen Proteinbestimmung mit Vergleichswerten aus der Literatur

n = Zahl der Untersuchungen

Spezies	Epithel Proteing. $\frac{mg}{g}$	Endothel Proteing. $\frac{mg}{g}$	Literatur
Schwein	$76,3 \pm 6,69$ n = 9	$23,1 \pm 4,22$ n = 8	diese Arbeit
Kanin- chen	$115 \pm 9,2$ -	-	REIM u. SCHRAMM
Kanin- chen	281	154	FRENCH u. DUMA
Rind	95,8	12,9	KAWERAU u. OTT

G. Ausführung der Messungen zur Bestimmung der

Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten nach den Testvorschriften von BÜCHER, LUH und PETTE. In einzelnen Fällen wurden Änderungen vorgenommen in Anpassung an die Untersuchung der geringen Gewebsmengen des Epithels und des Endothels. Die Testvorschriften sind daher am Schluß der Arbeit angegeben.

Die Extinktionsmessungen wurden am Vitatron Photometer mit Registriereinrichtung (Vitatron Scientific Instrumente, Dieren - Holland) und am Photometer Eppendorf (Fa. Nethler und Hinz, Hamburg - Wellingsbüttel) mit Skalenspreizung und Registriereinrichtung vorgenommen. Die Messungen erfolgten im allgemeinen in Normalcuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm; bei Enzymen mit geringen Extinktionsunterschieden in Halbmikrocuvetten mit einer Schichtdicke von 2 cm. Getestet wurde bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 7,6, bei einer Reaktionstemperatur von 25° C und bei einer Wellenlänge von 334 m μ im Vitatron Photometer und 366 m μ im Eppendorf Photometer.

Die biochemischen Reagenzien wurden bis auf wenige Ausnahmen, die in den Testvorschriften angegeben sind, durch die Firma C.F. Boehringer und Söhne GmbH., Mannheim-Waldhof, bezogen. Anstelle von quarzdestilliertem Wasser wurde ionenfreies Wasser verwendet, das mittels einer kleinen Wasseraufbereitungsanlage der Firma A. Lang, Zürich 47, gewonnen wurde und das stets einen Leitwiderstand von mehr als 2 Meg Ohm hatte. Die Testung eines Extraktes erfolgte bis auf wenige Ausnahmen noch an demselben Tag, an dem der Extrakt hergestellt worden war. Alle Enzymaktivitäten in den einzelnen Extrakten wurden mindestens doppelt mit verschiedenen großen Einsätzen bestimmt. Die Werte zeigten in der Regel weitgehende Proportionalität.

Gemessen wurden die Aktivitäten folgender Enzyme:

LDH, GDH, ALD, TIM, GAPDH, PGK, PK, GPM, F-6-PK, HK und GLDH.

H. Auswertung der Messungen

=====

Die Enzymaktivitäten wurden auf das Feuchtgewicht des frischen Gewebes bezogen. Ihre Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta E \times 10^6 \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{(\text{IE/g frisch}) \quad \text{Min} \times \epsilon \times d \times \text{Einsatzvol.} \times \text{Gewebsgewicht}}$$

wobei ist: IE = Internationale Einheit = $\mu\text{Mol/Min.}$
 ΔE = Extinktionsdifferenz
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 für 334 m μ = $6,09 \times 10^6$
 für 366 m μ = $3,3 \times 10^6$
 d = Schichtdicke der Cuvette

Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten erfolgte im Koordinatensystem nach LINEWEAVER und BURCK nach folgender Formel:

$$X = \frac{1}{K_m}$$

$$K_m = \frac{1}{X}$$

wobei X die Entfernung des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse vom Nullpunkt darstellt.
 Die Berechnung der statischen Parameter wurde nach den Formeln und Angaben der "Wissenschaftlichen Tabellen Geigy" 6. Auflage 1960 vorgenommen.

IV. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

A. Bestimmung von glykolytischen Enzymen im Epithel und

=====

Endothel der Cornea des Schweines und Kaninchens sowie

=====

im menschlichen Corneaepithel.

=====

Die Versuchsergebnisse sind in den Tabellen 4 - 15 zusammengefaßt und in den Abbildungen 2 - 6 graphisch dargestellt.

Tab. 4

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel der Schweinehornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

Enzym	M	S_M	n
LDH	491	39,5	18
GDH	0,4	0,122	4
TIM	349	28,2	4
GAPDH	103	9,92	15
PGK	153	29,7	9
GPM	95	6,48	7
PK	69	8,3	7
F-6-PK	8,9	1,03	4
ALD	4,8	0,28	16

M = Mittelwert

S_M = Standardabweichung des Mittelwertes

n = Zahl der Untersuchungen

Tab. 5

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Endothel der Schweinehornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

Enzym	M	S_M	n
LDH	160	18,4	13
GDH	0,24	0,048	4
TIM	311	50,5	6
GAPDH	40	2,66	11
PGK	84	6,79	10
GPM	43,9	6,36	12
PK	22,9	5,18	10
F-6-PK	1,5	0,29	9
ALD	2,5	0,2	13
GLDH	0,1	0,018	8

M = Mittelwert

S_M = Standardabweichung

n = Zahl der Untersuchungen

Tab. 6

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel der Kaninchenhornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

Enzym	diese Arbeit			REIM	KUHLMAN
	M	S _M	n		
LDH	3543	317,5	6	5180	8950
GDH	1,7	0,28	4	0,62	-
TIM	-	-	-	1216	-
GAPDH	409	42,16	5	673	-
PGK	127	17,4	5	169	-
GPM	49,7	8,05	3	98	-
PK	35	4,47	4	73	-
F-6-PK	5,8	-	2	-	-
ALD	3,9	0,46	6	5,43	1,4
GLDH	-	-	-	1,57	-

M = Mittelwert

S_M = Standardabweichung des Mittelwertes

n = Zahl der Untersuchungen

Tab. 7

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Endothel der Kaninchenhornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

n = Zahl der Untersuchungen. Mittelwerte.

Enzym	Aktivität	n
LDH	38,7	2
GDH	0,36	2
TIM	224	1
GAPDH	40,8	1
PGK	71,2	2
GPM	21,4	2
PK	3,5	1
F-6-PK	2,3	1
ALD	3,1	2
GLDH	0,13	2

Tab. 8

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Hornhautepithel des Menschen in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

Enzym	M	S_M	n
LDH	287	40,07	10
GDH	1,18	0,24	5
TIM	435	136	4
GAPDH	175	18,8	11
PGK	77,5	19,6	8
GPM	90	20,87	4
PK	222	23,2	8
HK	3,6	1,09	3
ALD	6,8	1,37	10
GLDH	1,64	-	1

M = Mittelwert

S_M = Standardabweichung des Mittelwertes

n = Zahl der Untersuchungen

B. Vergleich zwischen Epithel und Endothel der Cornea

bei verschiedenen Spezies

1. Schweinecornea

Die Enzymaktivitäten, bezogen auf das Frischgewicht, sind in Tabelle 9, Abbildung 2, wiedergegeben. Sie verteilen sich im Epithel wie auch im Endothel über drei Größenordnungen. Die Standardabweichungen der Mittelwerte S_M betragen in der Regel weniger als 10 % der Mittelwerte. Im Epithel liegen die Aktivitäten im allgemeinen höher als im Endothel. Im Endothel weist die TIM-Aktivität den höchsten Wert auf. Eine extrem niedrige Aktivität zeigt in beiden

Tab. 9

Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel und Endothel der Schweinehornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.). Mittelwerte

Enzym	Epithel	Endothel
LDH	491	160
GDH	0,4	0,24
TIM	349	311
GAPDH	103	40
PGK	153	84
GPM	95	43,9
PK	69	22,9
F-6-PK	8,9	1,5
ALD	4,8	2,5
GLDH	-	0,1

Gewebe die GDH. Die Aktivitäten der GAPDH, der PGK und der GPM sowie der ALD und der GDH sind im Epithel doppelt so hoch wie im Endothel. Die TIM weist im Epithel und Endothel der Schweinehornhaut eine annähernd gleich große Aktivität auf. Dreimal höher als im Endothel sind im Epithel die Aktivitäten der LDH und der PK. Am stärksten weichen die Werte für die F-6-PK voneinander ab. Ihre Aktivität liegt im Epithel um den Faktor 6 höher als im Endothel.

Bezieht man die gemessenen Enzymaktivitäten auf das extrahierbare Protein (Tab. 10), so erkennt man, daß sich die Relationen zwischen Epithel und Endothel der Schweinehornhaut teilweise umkehren. Wenn man eine gewisse Fehlerbreite der Proteinbestimmungen in den Endothelextrakten in Betracht zieht, kommt man zu dem Ergebnis, daß die Aktivitäten der GAPDH, PGK, GPM, ALD, PK, LDH und GDH im cytoplasmatischen Raum von Epithel und Endothel der Cornea gleich hoch liegen. Die Aktivitäten der TIM fallen im Endothel um den Faktor 3

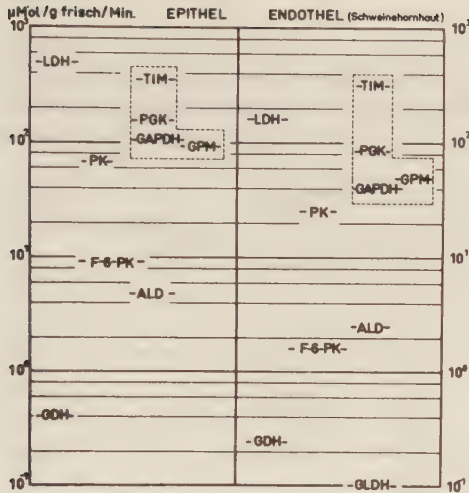


Abb. 2

Enzymverteilungsmuster der Cornea des Schweines. Neben der logarithmischen Ordinate sind an der Stelle der absoluten Werte der Aktivitäten die Namen der Enzyme durch symbolhafte Abkürzungen eingetragen. Links: Epithel, rechts: Endothel. Dimension: IE = $\mu\text{Mol} / \text{g feucht} / \text{Min.}$

höher aus als im Epithel. Ein auffallender Unterschied zwischen den Aktivitäten in den beiden Grenzschichten der Cornea ergibt sich auch bei der F-6-PK, die in Beziehung zum Proteingehalt im Epithel noch immer eine zweimal so hohe Aktivität aufweist wie im Endothel.

Die Befunde berechtigen zu der Annahme, daß die Enzymausstattung der glykolytischen Hauptkette des cytoplasmatischen Raumes in beiden Teilen der Schweinehornhaut im wesentlichen gleich ist mit Ausnahme der TIM und der F-6-PK. Dieser Unterschied zwischen Epithel und Endothel könnte vor allem im Hinblick auf die F-6-PK wichtig sein. Denn es handelt sich bei der F-6-PK nach Ansicht von HOHORST und von PETTE um ein Enzym, das in der Glykolysekette eine regulierende Funktion haben kann.

Tab. 10

Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel und Endothel der Schweinehornhaut auf das extrahierbare Protein bezogen. Dimension: IE = $\mu\text{Mol/g Protein/Min.}$ Mittelwerte.

Enzym	Epithel	Endothel
LDH	6450	6950
GDH	5,27	10,4
TIM	4500	13500
GAPDH	1360	1740
PGK	2000	3650
GPM	1250	1900
PK	910	1000
F-6-PK	112	65
ALD	63	109
GLDH	-	4,35

Die Werte dieser Tabelle wurden berechnet, indem die Enzymaktivitäten der Tab. 9 [$\mu\text{Mol/g feucht/Min.}$] durch den Proteingehalt [mg/g] dividiert und mit dem Faktor 1000 multipliziert wurden.

2. Kaninchencornea

Im Endothel der Kaninchenhornhaut wurde die Bestimmung der Enzymaktivitäten nur zweimal durchgeführt, da jeweils nur sehr geringe Gewebsmengen zur Verfügung standen. Der Vergleich zwischen Epithel und Endothel der Kaninchenhornhaut zeigt, daß im Epithel die Aktivitäten der meisten glykolytischen Enzyme weit über den im Endothel bestimmten Werten liegen (Tab. 11, Abb. 3). So liegt die LDH-Aktivität im Epithel um den Faktor 100 höher als im Endothel. Diese extrem hohe Aktivität der LDH im Epithel der Kaninchenhornhaut wurde bereits von KUHLMAN gemessen und durch REIM und SCHRAMM bestätigt. Im Endothel

Tab. 11

Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel und Endothel der Kaninchenhornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).
Mittelwerte.

Enzym	Epithel	Endothel
LDH	3543	38,7
GDH	1,7	0,36
TIM	1216 *)	224
GAPDH	409	40,8
PGK	127	71,2
GPM	49,7	21,4
PK	35	3,5
F-6-PK	5,8	2,3
ALD	3,93	3,1
GLDH	1,57 *)	0,13

*) REIM und SCHRAMM

zeigt die TIM die höchste Aktivität. Im Epithel konnte sie leider aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Der von REIM und SCHRAMM im Epithel der Kaninchenhornhaut bestimmte Wert zeigt aber, daß die Aktivität der TIM im Epithel um den Faktor 5 höher liegt als im Endothel. Die Aktivitäten der GAPDH und der PK sind im Epithel 10mal höher als im Endothel. Die GPM und die PGK haben im Epithel eine doppelt so hohe Aktivität wie im Endothel. Niedrig sind in beiden Geweben die Aktivitäten der GDH, der ALD und der F-6-PK. Da bei der Untersuchung des Endothels der Kaninchenhornhaut jeweils nur sehr geringe Gewebsmengen zur Verfügung standen, wurden keine Proteinbestimmungen der Extrakte durchgeführt. Die Enzymaktivitäten konnten daher nicht auf das extrahierbare Protein bezogen werden.

Man könnte annehmen, daß auch in der Kaninchenhornhaut die Enzymausstattung des cytoplasmatischen Raumes im Epithel und Endothel gleich ist. Wenn man aber die Aktivitäten der Tabelle 11 auf die Werte von FRENCH und DUMA für das extrahierbare Protein bezieht, bleiben noch immer erhebliche Unterschiede der Enzymaktivitäten zwischen Epithel und Endothel: Die GAPDH-, PK- und GLDH-Aktivitäten der einzelnen Endothelanalysen liegen noch immer 5mal niedriger als die Werte des Epithels und die LDH um das 50 fache.

Da die Streubreite der Enzymaktivitätsbestimmungen gerade bei geringen Gewebseinsätzen sehr groß ist, kann man die Untersuchungen des Endothels der Kaninchenhornhaut nicht als endgültig betrachten.

Die sehr hohe LDH-Aktivität und die gegenüber dem Endothel z.T. auch wesentlich höheren Aktivitäten der glykolytischen Hauptkettenenzyme im Epithel scheinen darauf hinzudeuten, daß im Epithel der Kaninchenhornhaut die glykolytischen Reaktionen eine besondere Bedeutung haben, während im Corne endothel von Kaninchen die glykolytischen Enzyme keine auffallenden Aktivitäten zeigen.

C. Enzymaktivitäten der Glykolyse im Corneaepithel des
=====

Menschen
=====

Die Aktivitäten von den im Hornhautepithel des Menschen bestimmten glykolytischen Enzymen verteilen sich wie bei den untersuchten Tierarten über 3 Größenordnungen (Tab. 8, Abb. 4). Die höchste Aktivität weist die TIM auf. Ihr folgen in der Höhe der Aktivitäten die LDH und die PK.

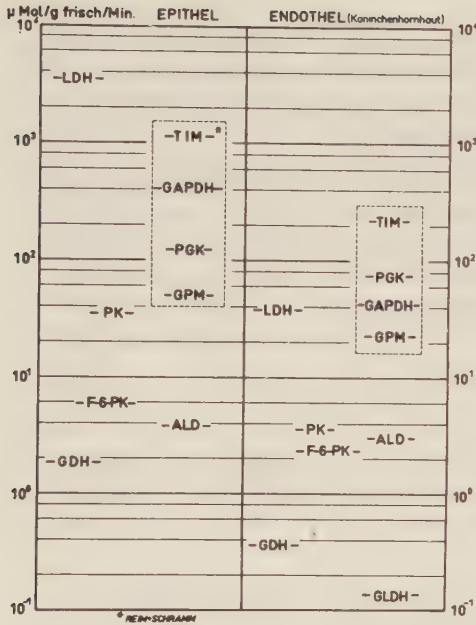


Abb. 3

Enzymverteilungsmuster der Cornea des Kaninchens.
Links: Epithel,
Rechts: Endothel.
Dimension: IE = $\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.

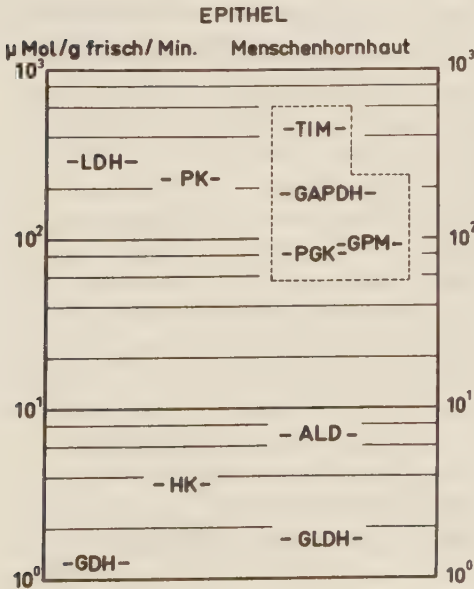


Abb. 4

Enzymverteilungsmuster des Corneaepithels des Menschen.
Dimension: IE = $\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.

Mittlere Aktivitäten zeigt die GAPDH. Die Aktivitäten von PGK und GPM liegen um den Faktor 2 niedriger als die GAPDH-Aktivität. Die HK, die ALD, die GDH und die GLDH weisen relativ niedrige Aktivitäten auf.

Im Endothel von menschlichen Hornhäuten konnten keine Enzymbestimmungen durchgeführt werden, weil es nicht möglich war, das Endothel von menschlichen Augen zu gewinnen. Deshalb muß in der menschlichen Cornea auf ein Vergleich zwischen Epithel und Endothel verzichtet werden.

D. Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Epithel
=====

der Cornea verschiedener Spezies
=====

Die Höhe und Verteilung der Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse zeigen im Hornhautepithel von Schweinen, Kaninchen und Menschen gewisse Ähnlichkeiten. Das Hornhautepithel des Menschen scheint dem Epithel der Schweinehornhaut ähnlicher zu sein als demjenigen der Kaninchenhornhaut (Tab.12, Abb.5).

Die hohe Aktivität der LDH im Hornhautepithel des Kaninchens ist ein charakteristisches Kennzeichen des Kaninchenepithels, wie die extrem hohe IDH-Aktivität des Corneae epithels von Rindern, die DELBRÜCK herausgestellt hat. Bei Menschen und Schweinen liegen keine so extrem hohen Aktivitäten einzelner Enzyme vor. Im Epithel der Menschenhornhaut zeigt die TIM die höchste Aktivität, während in den Hornhautepithelien von Schweinen und Kaninchen die LDH die höchste Aktivität besitzt. Die Aktivität der TIM ist in den Epithelien von Menschen und Schweinen etwa gleich groß. Bemerkenswert ist die hohe PK-Aktivität im Epithel der Menschenhornhaut. Die GPM hat im Epithel von Schweinen und von Menschen eine gleich große Aktivität. Im Hornhautepithel des Kaninchens liegt sie um den Faktor 2 niedriger, die Aktivitäten der GAPDH sind in den drei untersuchten

Tab. 12

Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Hornhaut-
epithel des Schweines, Kaninchens und des Menschen in
internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).
Mittelwerte.

Enzym	Schwein	Kaninchen	Mensch
LDH	491	3543	287
GDH	0,4	1,7	1,18
TIM	349	1216 *)	435
GAPDH	103	409	175
PGK	153	127	77,5
GPM	95	49,7	90
PK	69	35	222
HK	-	-	3,6
F-6-PK	8,9	5,8	-
ALD	4,8	3,93	6,3
GLDH	-	1,57 *)	1,64

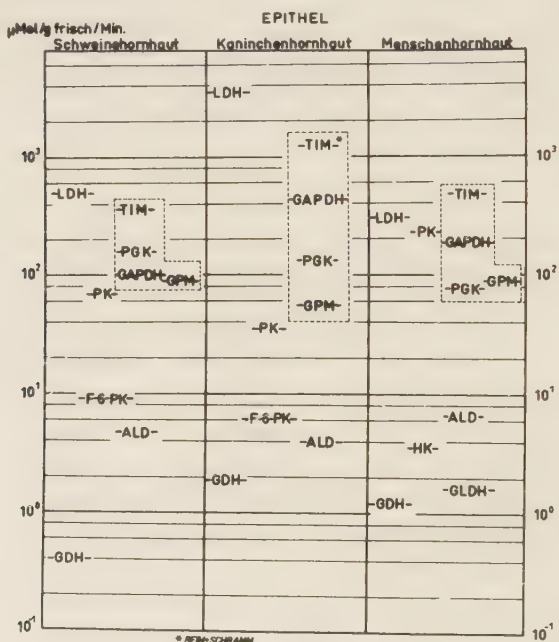
*) REIM und SCHRAMM

Abb. 5

Enzymverteilungsmuster des Corneaepithels von Schwein, Kaninchen und Mensch.

Links: Schwein Mitte: Kaninchen Rechts: Mensch

Dimension: IE = $\mu\text{Mol/g feucht/Min.}$



Gewebe verschieden, beim Kaninchen doppelt so hoch wie beim Menschen und viermal so hoch wie beim Schwein.

Die PGK-Aktivität weist im Epithel der Schweine- und Kaninchenhornhaut einen annähernd gleich großen Wert auf. Im Epithel der Menschenhornhaut liegt sie nur halb so hoch. Die ALD zeigt als Hauptkettenenzym bei allen drei untersuchten Spezies eine sehr niedrige Aktivität, so daß bei maximalen Flußraten über die Glykolysekette eine Ventilwirkung durch

die ALD möglich scheint. Auch die GDH besitzt im Epithel von Schweinen, Kaninchen und Menschen eine sehr niedrige Aktivität, so daß es fraglich erscheint, ob der Glycero-phosphat-Cyklus in der Hornhaut eine große Bedeutung hat.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes können folgendermaßen zusammengefaßt werden: Das Hornhautepithel des Kaninchens weist eine sehr hohe LDH-Aktivität auf, die vergleichbar ist mit der stark erhöhten TPN-abhängigen IDH-Aktivität des Corneaepithels von Rindern. Bei Menschen und bei Schweinen liegen keine so hohen Aktivitäten einzelner Enzyme vor. Die glykolytischen Enzyme TIM und GAPDH zeigen im Corneaepithel des Kaninchens weit höhere Aktivitäten als bei Schweinen und Menschen. Das Corneaepithel des Menschen besitzt eine stärkere PK-Aktivität als diejenigen der im Vergleich untersuchten Tierarten.

E. Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Endothel

der Cornea von Schweinen und Kaninchen

Die Verteilung von Enzymaktivitäten der Glykolyse ist im Hornhautendothel des Schweines und Kaninchen ähnlich (Tab. 13, Abb. 6). Die Aktivitäten der meisten Enzyme liegen aber im Endothel der Schweinehornhaut höher als im Endothel der Kaninchenhornhaut. Die TIM zeigt in beiden Geweben die höchste Aktivität. Die LDH-Aktivität liegt im Endothel der Schweinehornhaut 4 x höher als bei Kaninchen. Noch größer scheinen die Unterschiede bei der PK zu sein. Dieses Enzym zeigt im Corneaendothel bei Schweinen eine 6 x höhere Aktivität als bei Kaninchen. Die Aktivitäten der GAPDH und PGK sind bei beiden Spezies gleich groß. Die GPM weist im Endothel von Schweinen eine um den Faktor 2 höhere Aktivität auf als bei Kaninchen. Relativ niedrig sind im Endothel wie auch im Epithel die Aktivitäten von GDH, GLDH, ALD und P-6-PV.

Tab. 13

Vergleich von Enzymaktivitäten der Glykolyse im Hornhautendothel des Schweines und Kaninchens in internationalen Einheiten. ($\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.).

Mittelwerte.

Enzym	Schwein	Kaninchen
LDH	160	38,7
GDH	0,24	0,36
TIM	311	224
GAPDH	40	40,8
PGK	84	71,2
GPM	43,9	21,4
PK	22,9	3,5
GLDH	0,1	0,13
F-6-PK	1,5	2,3
ALD	2,5	3,1

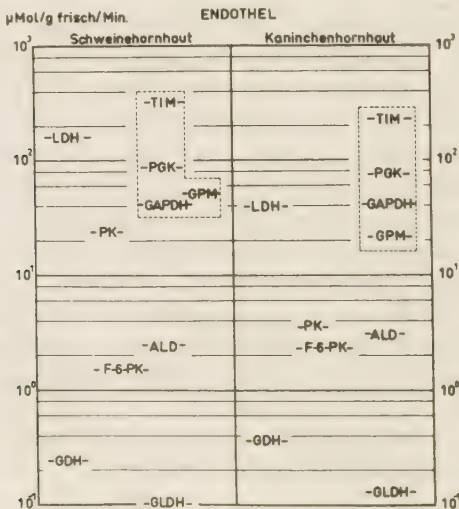
Abb. 6

Enzymverteilungsmuster des Corneaendothels von Schwein und Kaninchen.

Links: Schwein

Rechts: Kaninchen.

Dimension : IE = $\mu\text{Mol/g}$ feucht/Min.



F. Beziehung zwischen Enzymaktivität und Corticosteroiden
=====

ESTRADA SERGIO und CORDOBALA konnten nach portaler Infusion von Cortisol ein deutliches Ansteigen der Glutamat-Aspartat-Transaminase in der Leber nachweisen. GELLER, YUWIER und SHAPIRO gelang dies in der Leber für die Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase, Tryptophan- α -Ketoglutarat-Transaminase und die Tryptophan-Pyrrolase zu zeigen. Diese Befunde ließen die Frage aufkommen, ob nicht auch in der Hornhaut eine Induktion von Enzymen durch Corticosteroidgaben bewirkt werden kann. Nach Angaben von WINE, GORNALL und BASU werden C¹⁴ Hydrocortisone vom Auge durch die Hornhaut aufgenommen. Das Maximum der Resorption von C¹⁴ Hydrocortisonen durch die Hornhaut liegt in den ersten 30 Minuten. Da Corticosteroide in großem Maße in der Augenheilkunde therapeutisch verwendet werden, haben wir - wie bereits im methodischen Teil geschildert - einige Kaninchen mit Ultracortenol behandelt. Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten in den Hornhautepithelien der behandelten Tiere ließen sich jedoch keine auffallenden Veränderungen der Enzymaktivitäten erkennen.

Nach den Hinweisen aus der Literatur muß angenommen werden, daß Corticosteroide bei hoher Anwendung durch die Hornhaut und die Bindehaut resorbiert werden. Man kann daher den Schluß ziehen, daß Corticosteroide die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme im Hornhautepithel nicht verändern.

G. Relationen der Enzymaktivitäten zueinander
=====

Die Relationen der Aktivitäten LDH / GDH sind in beiden Teilen der Hornhaut von Schwein und Kaninchen sowie im Hornhautepithel des Menschen verschieden (Tab. 14). PETTE, LUH und BÜCHER haben bereits früher auf die teilweise großen Unterschiede der Relation der Aktivitäten dieser Enzyme

Tab. 14

Relation der Aktivitäten der LDH und GDH in verschiedenen Geweben.

Gewebe	LDH / GDH
Corneaepithel =====	
Schwein	1228
Kaninchen	2084
Mensch	243
Corneaendothel =====	
Schwein	667
Kaninchen	108
Lymphosarkom (Ratte)	1400 *)
WALKER Ca (Ratte)	900 *)
Skelettmuskel (Ratte)	6 *)
Leber (Ratte)	4 *)

*) DELBRÜCK, BARTSCH, SCHIMASSEK und BÜCHER

in verschiedenen Geweben hingewiesen. Der LDH/GDH-Quotient ist in den in dieser Arbeit untersuchten Geweben sehr groß. Nach DELBRÜCK, BARTSCH, SCHIMASSEK und BÜCHER kommt ein derartig hoher LDH/GDH-Quotient auch in malignen Tumoren vor.

Die Relationen der Proportionskonstanten Phospho - Triose - Glycerat - (PTG-) Gruppe weichen zum Teil von den von PETTE mitgeteilten Zahlen ab (Tab. 15).

Die Unterschiede sind aber nicht so groß, als daß man eine Proportionskonstanz der Enzyme in der Phospho - Triose - Glycerat - Gruppe bei den untersuchten Geweben ganz ablehnen muß.

Tab. 15

Relationen der Enzyme der Phospho-Triose-Glycerat-Gruppe in verschiedenen Geweben.

Gewebe	PGK/GAPDH	GPM/GAPDH	TIM/GAPDH
Corneaepithel =====			
Schwein	1,5	0,92	3,4
Kaninchen	0,31	0,12	1,8 +
Mensch	0,44	0,5	2,4
Corneaendothel =====			
Schwein	2,1	1,09	7,78
Kaninchen	1,74	0,51	5,49
Kaninchenmuskel Rattenleber und -gehirn	0,6-1,2*)	0,6-1,2*)	6-12*)

+ REIM und SCHRAMM

*) PETTE, LUH und BÜCHER

Die Werte für das Kaninchenepithel liegen aber wesentlich niedriger als die von PETTE, LUH und BÜCHER angegebenen Grenzen. Diese Unterschiede sind auf die relativ hohe GAPDH-Aktivität zurückzuführen. Die hohen Aktivitäten der GAPDH wie der LDH scheinen eine besondere Eigenschaft des Hornhautepithels beim Kaninchen zu sein.

Die Auswertung der Relationen der Enzymaktivitäten läßt beim Hornhautepithel zwei Befunde hervortreten : Der hohe LDH/GDH-Quotient, der durch die extrem hohe LDH-Aktivität im Kaninchenepithel noch unterstrichen wird und die Verzerrung der Proportionskonstanz durch sehr hohe GAPDH-Werte im Kaninchenepithel.

V. SCHLUSSBETRACHTUNG

Um die Kenntnisse über die Stoffwechselwege in der Cornea zu erweitern, wurden im Epithel und Endothel der Hornhaut von Schweinen, Kaninchen und im Corneae epithel von Menschen verschiedene Enzyme der Glykolyse bestimmt. Nach Angaben der Literatur sind sich im histologischen Bild die Epithelien bei diesen drei Spezies ähnlich. Das gleiche gilt für das Endothel. Im Endothel finden sich mehr Mitochondrien als im Epithel. Dagegen zeigt das Epithel einen reicher entwickelten Golgi-Apparat, reichlich endoplasmatisches Retikulum und Tonofibrillen. Bei der in dieser Arbeit angewandten Extraktionsmethode wurden nur die Enzyme des cytoplasmatischen Raumes erfaßt.

Obwohl der anatomische Aufbau der Grenzschichten der Cornea bei den drei untersuchten Arten ähnlich ist, bestehen Unterschiede in der Enzymausstattung der Glykolysekette.

Das Hornhautepithel des Kaninchens weist eine sehr hohe LDH-Aktivität auf, die vergleichbar ist mit der stark erhöhten, TPN-abhängigen IDH-Aktivität von Rindern (DELBRÜCK). Bei Menschen und bei Schweinen liegen keine so hohen Aktivitäten einzelner Enzyme vor. Auch die Enzyme TIM und GAPDH zeigen im Corneae epithel von Kaninchen weit höhere Aktivitäten als bei Schweinen und Menschen. Das Corneae epithel des Menschen besitzt eine stärkere PK-Aktivität als bei den zum Vergleich untersuchten Tierarten.

Allgemein sind die Enzymaktivitäten im Epithel höher als im Endothel, wenn man sie auf das Gewebsgewicht bezieht.

Beim Schwein liegen im Epithel die Aktivitäten meist um den Faktor 2-3 höher als im Endothel. Nur die F-6-PK zeigt im Epithel der Schweinehornhaut einen 6mal höheren Wert als im Endothel. Bezieht man die Enzymaktivitäten auf den Proteingehalt der Extrakte, so sind die Aktivitäten der meisten glykolytischen Enzyme im Endothel der Schweinecornea so hoch wie im Epithel. Eine wesentliche Differenz zwischen Epithel

und Endothel bleibt nur für die Aktivitäten der F-6-PK und der TIM: Erstere liegt im Epithel noch immer dreimal höher und letztere dagegen um das dreifache niedriger als im Endothel. In den zellreichen Grenzsichten der Cornea finden sich ähnlich hohe LDH/GDH-Quotienten von 200-2000, wie in verschiedenen malignen Tumoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Cornea im Hinblick auf Speziesunterschiede noch größere Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte. Man möchte annehmen, daß die Glykolyse vor allem im Hornhautepithel von Kaninchen eine besondere, bisher noch nicht erklärbare Rolle spielt. Auch andere Autoren fanden ein auffallendes Verhalten glykolytischer Reaktionen des Hornhautepithels: z.B. NEGELEIN und WARBURG beobachteten schon vor 40 Jahren die hohe aerobe Glykolyse des Corneaepithels von Ratten. LANGHAM fand bei Kaninchen eine verstärkte Lactatproduktion bereits bei geringfügig verminderter Sauerstoffspannung über der Cornea. Schließlich ergaben sich bei Metabolitanalysen des Corneaepithels von Kaninchen mit verschiedenen Präparationsmethoden auffallend hohe Lactatgehalte (REIM, SCHMIDT, MEYER).

Neuerdings wurden auch die verschiedenen LDH-Isoenzyme aus dem Corneaepithel untersucht. BERNSTEIN, KERRIGAN und HARRY fanden im Kaninchenepithel 4 anodische Isoenzyme der LDH, die Typen 1 - 4; beim Rinderepithel erschienen dagegen nur 3 anodische LDH-Banden, die Typen 3 - 5.

GRAYMORE untersuchte ebenfalls die LDH im Hornhautepithel von Kaninchen. Die absoluten Aktivitäten aus seinen Messungen (1930 E/g) stimmten in ihrer Größenordnung mit den hier gefundenen Werten überein. Bei der elektrophoretischen Trennung der Isoenzyme erschienen nur 3 anodische Banden, die LDH-Isoenzyme Typ 1 - 3.

Es zeigten sich damit also im Corneaepithel nicht nur Speziesunterschiede im Hinblick auf die Enzymaktivitäten, sondern auch in der Zusammensetzung der Proteinfractionen der LDH. Ob es sich bei den verschiedenen LDH-Isoenzymen um eine

artbedingte Variante in der Proteinsynthese handelt, oder ob diese Befunde Ausdruck einer morphologischen oder funktionellen Besonderheit des glykolytischen Systemes im Corneaepithel sind, bedarf noch einer Klärung durch weitere Untersuchungen. Es könnten z.B. verschiedene Arten von Epithelzellen vorliegen, wie sie von verschiedenen Autoren histologisch beschrieben wurden (TENG; PAU und CONRADS). Auch eine intrazelluläre Kompartimentierung der Glykolyse in ähnlicher Weise wie sie HOHORST für den Muskel postuliert hat, mit jeweils unterschiedlichen LDH-Typen, wäre denkbar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Epithel und Endothel der Cornea von Schweinen und Kaninchen, sowie im Hornhautepithel von Menschen wurden die Aktivitäten folgender Enzyme im enzymatisch-optischen Test bestimmt: LDH, GDH, TIM, GAPDH, PGK, GPM, PK, F-6-PK, ALD und GLDH. Die Testmethoden wurden durch kinetische Untersuchungen und die Gewebsextraktion durch Anwendung verschiedener Medien überprüft. In den Gewebsextrakten erfolgten Proteinbestimmungen.

Obwohl der anatomische Aufbau der Grenzsichten der Cornea bei den drei untersuchten Arten ähnlich ist, bestehen Unterschiede in der Enzymausstattung der Glykolysekette.

Das Hornhautepithel des Kaninchens weist eine sehr hohe LDH-Aktivität auf, die vergleichbar ist mit der stark erhöhten, TPN-abhängigen IDH-Aktivität des Corneaepithels von Rindern (DELBRÜCK). Bei Menschen und Schweinen liegen keine so hohen Aktivitäten einzelner Enzyme vor. Auch die Enzyme TIM und GAPDH zeigen im Corneaepithel von Kaninchen weit höhere Aktivitäten als bei Schweinen und Menschen. Das Hornhautepithel des Menschen besitzt eine stärkere PK-Aktivität als bei den zum Vergleich untersuchten Tierarten.

Allgemein sind die Enzymaktivitäten im Epithel höher als im Endothel, wenn man sie auf das Gewebsgewicht bezieht. Beim Schwein liegen im Epithel die Aktivitäten meist um den Faktor 2 - 3 höher als im Endothel. Nur die F-6-PK zeigt im Epithel der Schweinehornhaut einen sechsmal höheren Wert als im Endothel.

Bezieht man die Enzymaktivitäten auf den Proteingehalt der Extrakte, so sind die Aktivitäten der meisten glykolytischen Enzyme im Epithel und Endothel der Schweinecornea gleich hoch. Eine wesentliche Differenz zwischen Epithel und Endothel bleibt nur für die Aktivität der F-6-PK und der TIM. In den zellreichen Grenzschichten der Cornea finden sich ähnlich hohe LDH/GDH-Quotienten von 200-2000, wie in verschiedenen malignen Tumoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Cornea im Hinblick auf Speziesunterschiede noch größere Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte.

Literaturverzeichnis

- BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R.CZOK, K.H.GARBADE, E.MEYER ARENDT, G.PFLEIDERER : Diphospho-fructo - Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat - Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. f.Naturforschung 8 b, 6. 555, 1953
- BERNSTEIN, L., M. KERRIGAN and M.HARRY : Lactic Dehydrogenase Isozymes in Lens and Cornea. Exptl. Eye Res. 5, 309 - 314
- BÜCHER, Th., W. LUH, D. PETTE : Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden, Handbuch der physiologisch - und pathologisch - chemischen Analyse, 10. Auflage, B VI, Teil A, S. 292, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York 1964
- CALMETTES, L., F. DEODATI, H. PLANEL, P. BEC : Etude histologique et histochemique de l'épithélium antérieur de la cornée et de ses basales. Arch. Ophthal., (Paris) 16, 481, 1956
- DAVSON, H. : The Eye, Bd. 1, Vegetative Physiology and Biochemistry, Academic Press, London, New York, 1962
- DELBRÜCK, A. : Enzymverteilungsmuster gefäßloser Gewebe. Klin. Wschr. 41, 488, 1963
- , H.SCHIMASSEK, K.BARTSCH und Th.BÜCHER : Enzymverteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus. Biochem. Z., Bd. 331. S. 297 - 311 (1959)
- , E. ZEBE, Th. BÜCHER : Über Verteilungsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Flug-muskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung. Biochem.Z.331, 273, 1959.

- DUKE- ELDER, W.S., E.S.PERKINS : The transparency of the cornea.
Blackwell Sci.Publ. Oxford 1960
- FRANCOIS, J., M.RABAEY : "The anatomy of the cornea". In: The
transparency of the cornea. Edit.
W.S.DUKE - ELDER, E.S.PERKINS, Blackwell
Sci. Publ. Oxford 1960
- FRENCH, R., Z.DUMA : Studies on protein metabolism of the
cornea. I : The distribution of nitrogen-
ous solids in rabbit cornea. Canad. J.
Biochem. 41, 1005, 1963
- GELLER, E., A.YUWILER and S.SHAPIRO : Comparative Effects of a
Stress and Cortisol upon some Enzymic
Aktivities. Biochem. Biophys. Acta.
93, 1964, S. 311 - 315
- GRAYMORE, C.N. and McCORMICK, A.: LDH in the cornea.I Content,
Nature and Distribution. Exptl. Eye
Res. 5, 315 - 324
- JAKUS, M.A. : "The fine structure of certain ocular
tissues." 4.Int. Kongreß Elektronen-
mikroskopie 1958 Verhandlungen. Heraus-
gegeben: W.Bergmann, G.Mollenstedt, H.
Niehrs, D. Peters, E. Ruska, C. Wolpers.
Springer Verlag Berlin, Göttingen,
Heidelberg 1960, S. 344.
- , : "The fine structure of the human cornea."
In: The structure of the eye. Edit. G.K.
SMEISER, Academic Press New York, London,
1961, S. 343
- KAYE, G.I., G.D.PAPPAS : Studies on the cornea. I:Fine structure
of the rabbit cornea and the uptake and
transport of colloidal particles by the
cornea in vivo. J. Cell. Biol. 12, 457,
1962.

- KAWERAU, E., H.OTT : The soluble proteins of the cornea.
Paper and immunoelectrophoretic studies .
Exp. Eye Res. 1, 137, 1961
- KINOSHITA, J.H., T.MASURAT : The direct oxydative carbohydrate
cycle of bovine corneal epithelium.
Archiv. Biochem. Biophys. 53, 9, 1954
- KUHLMAN, R.E. : Spezies variation in the enzyme content
of the corneal epithelium. J. Cell. comp.
Physiol. 53, 313, 1959
- , R.A.RESNIK: Quantitative histochemical changes in the
development of the rat lens and cornea.
Amer. J. Ophthal. 46, II, 47, 1958
- LANGHAM, M.E. : Glykolysis in the cornea of the rabbit.
J. Physiol., 126, 396, 1954
- MAURICE, D.M. : The cornea and sclera. In the Eye, Band 1,
Edit. H. DAVSON, Academic Press 1962
London, New York
- PEDLER, C. : The fine structure of corneal epithelium.
Exp. Eye Res. 1, 286, 1962
- PENA - CARILLO, J. : Histochemical aspects of the rabbits
normal cornea and of experimental
corneal grafts. Ophthalmologia 146, 260, 1963
- PETTE, D. : "Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel."
Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher
Naturforscher und Ärzte, 103. Versammlung
zu Weimar 1964, Springer Verlag Berlin,
Heidelberg, New York 1965, S. 91.
- , Th.BÜCHER : Proportionskonstante Gruppen in Beziehung
zur Differenzierung der Enzymaktivitäts-
muster von Skelettmuskeln des Kaninchens-
Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem. 331,
180, 1963
- , W.LUH u. Th.BÜCHER : Constant - proportion groups of Enzymes
of Embden - Meyerhof - Chain. Biochem.
Biophys. Res. Commun. 7, 419, 1962

- , and W. LUH : Constant - proportion groups of multi-located enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 283, 1962
- PIRIE, A., R. VAN HEYNINGEN : Biochemistry of the eye. Blackwell Sci. Publ. Oxford 1956
- PRAUS, R., J. OBENBERGER : The importance of epithelium in the incorporation of radioactive sulphate into the acid mucopolysaccharides of isolated cornea. Ref. in Ophthal. Lit. 18, 52/53, 1964. Cs. Ophthal. 20. 1964, S. 13 - 26
- REIM, M. : Untersuchung über Enzymaktivitäten und Metabolitgehalte des energieliefernden Stoffwechsels in der Hornhaut. Habil.-Schrift Marburg 1966
- , F. SCHMIDT und D. MEYER : Die Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhaut-epithel verschiedener Säugetiere. Bericht über die 67. Zusammenkunft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Heidelberg 1965, S. 164 - 171
- , H.P. SCHRAMM : Beitrag zur biochem. Wirkung des IUDR auf die Hornhaut. A. v. Graefes Archiv f. Ophthal. 168, 185, 1965
- RHODIN, J.A.G. : An atlas of ultrastructure. W.B. SAUNDERS Company Philadelphia, London 1963
- ROHEN, J. W. : Das Auge und seine Hilfsorgane. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. III : Haut und Sinnesorgane, 4. Teil, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York 1964
- SCHWARZ, W. : Electron microscopical studies of the fibrillogenesis in the human cornea. In: The structure of the eye. Edit. G.K. SMELSER, Academic Press 1961, New York, London S. 393

- SERGIO ESTRADA, O. and F.CORDOBALA: Cortisol Activations of Rat Liver Glutamate Aspartate Transaminase (GOT). Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol 12, No. 6, 1963
- TENG, C. C. : The fine structure of the corneal epithelium and basement membrane of the rabbit. Amer. J. Ophthal. 51, 278, 1961
- TESTA, M. : Aktivita transaminasica dell'epitelio corneale di bue Boll. Oculist. 39, 379, 1960
- VIRCHOW, H. : Mikroskopische Anatomie der äußeren Augenhaut und des Lidapparates. Handbuch der gesamten Augenheilkunde 2.Aufl., 1. Band, Herausgegeben von Th. Saemisch, 1910, 1.Abt., W.Engelmann, Leipzig
- WINE, N.A., A.G. GORNALL and P.K. BASU : The ocular uptake of subconjunctivally injected C¹⁴ Hydrocortisone. Amer. J. Ophthal. 58, 365, 1964

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ALD	1,6, di - Phosphofructaldolase
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Bücher - Einheiten
BTS	Brenztraubensäure
c	mg/ml
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
2,3 - di - PGS	2,3 - Diphosphoglycerat
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid reduziert
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ENO	Enolase
FDP	Fructose - 1,6 - diphosphat
FDP-C	Fructose - 1,6 - diphosphat, Cyclohexylammoniumsalz
F-6-PK	Fructose - 6 - Phosphatkinase
GAP	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat - Dehydrogenase
GDH	α - Glycerophosphat - Dehydrogenase
GLDH	Glutamat - Dehydrogenase
GOT	Glutamat - Oxalacetat - Transaminase
G-6-PDH = ZF	Glucose - 6 - Phosphat - Dehydrogenase
GPM	Phosphoglyceromutase
GPT	Glutamat - Pyruvat - Transaminase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSGDH	Glutathionreductase
HK	Hexokinase
IDH	Isocitronensäure - Dehydrogenase
α - KG	α - Ketoglutarsäure
MDH	Malat - Dehydrogenase
PEP	Phosphoenol - Pyruvat
PEP-C	Phosphoenol - Pyruvat, Tri-Cyclohexylammoniumsalz
3-PG-C	3-Phosphoglycerat - Cyclohexylammoniumsalz
6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PGK	Phosphoglycerat - Kinase
2-PGS	2-Phospho-Glycerinsäure
3-PGS	3-Phospho-Glycerinsäure
PK	Pyruvatkinase
S	Substratkonzentration

TCA	Trichloressigsäure
TIM	Triosephosphat - Isomerase
TPN	Triosepyridinnucleotid, oxydiert
TRAP	Triäthanolaminpuffer
v	Reaktionsgeschwindigkeit

Enzymbestimmungen

Testansätze

Lactat-Dehydrogenase - L D H

TRAP	50 mM	0,5 ml TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5 mM	pH 7,6
DPNH	0,22 mM	0,02 ml DPNH 11 mM , c = 8
Extrakt		0,01 - 0,03 ml Hornhautepithel
		Kaninchen 1 : 100
		Mensch 1 : 10
Wasser		ad 0,99

BTS 1,0 mM 0,01 ml BTS 100 mM , c = 11

Schreibskala 0 - 1,0 ; d = 1, Normalcuvette

Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase - G D H

TRAP	50 mM	0,5 ml TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5 mM	pH 7,6
DPNH	0,22 mM	0,02 ml DPNH 11 mM , c = 8
DAP	1,0 mM	nach der jeweils bestimmten Konzentration des Präparates (Sigma Chemical Comp. St.Louis)
Wasser		0,95 ml

Extrakt 0,05 ml Hornhautepithel

Schreibskala 0 - 0,250 ; d = 2

Triosephosphat-Isomerase T I M

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM				pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02	ml	DPNH	11 mM, c = 8
GAP	1,5	mM				nach der jeweils bestimmten Konzentration des Präpara- tes (Sigma Chemical Comp. St. L.)
GDH	40 BE/ml		0,02	ml	GDH	c = 10, 1 : 10
Wasser		ad	0,98			
Extrakt			0,02	ml	Hornhautepithel	1 : 10

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

Hexokinase H K

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP	100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM				pH 7,6
TPN	0,3	mM	0,02	ml	TPN	15 mM, c = 12,5
Mg ++	8	mM	0,05	ml	MgCl ₂	160 mM
ATP	1,5	mM	0,02	ml	ATP	75 mM, c = 45,5
D-Glucose	2	mM	0,02	ml	D-Glucose	100 mM
G-6-PDH	40 BE/ml		0,01	ml	G-6-PDH	c = 5, 1 : 10
Wasser		ad	0,95	ml		
Extrakt			0,05	ml	Hornhautepithel	

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase G A P D H

TRAP	50 mM	0,5 ml	TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5 mM		pH 7,6
DPNH	0,22 mM	0,02 ml	DPNH 11 mM, c = 8
Mg ⁺⁺	3,3 mM	0,05 ml	MgCl ₂ 66 mM
GSH	2,4 mM	0,05 ml	GSH 50 mM, c = 15
			jedesmal frisch ansetzen
ATP	1,5 mM	0,02 ml	ATP 75 mM, c = 45,5
3-PGS	7 mM	0,05 ml	3-PG-C 140 mM = 75 mg/ml
PGK	200 BE/ml	0,02 ml	PGK c = 10, 1 : 10
Wasser	ad	0,98 ml	

Extrakt 0,02 ml Hornhautepithel
 Kaninchen 1 : 10

Schreibskala 0 - 1,0 ; d = 1 ; Normalcuvette

3-Phosphoglycerat-Kinase P G K

TRAP	50	mM	0,5	ml	TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM			pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02	ml	DPNH 11 mM, c = 8
Mg ⁺⁺	6,6	mM	0,10	ml	MgCL ₂ 66 mM
GSH	2,4	mM	0,05	ml	GSH 50 mM, c = 15
					jedesmal frisch ansetzen
ATP	1,5	mM	0,02	ml	ATP 75 mM, c = 15
3-PGS	14	mM	0,10	ml	3-PG-C 140 mM, c = 75
GAPDH	100	BE/ml	0,005	ml	GAPDH unverdünnt
Wasser			ad	0,99	ml
Extrakt				0,01	ml Hornhautepithel

Schreibskala 0 - 1,0 ; d = 1 ; Normalcuvette

Phosphoglyceromutase G P M

TRAP	50 mM	0,5	ml	TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5 mM			pH 7,6
DPNH	0,22mM	0,02	ml	DPNH 11 mM, c = 8
Mg ⁺⁺	8 mM	0,05	ml	MgCl ₂ 160 mM
KCl	75 mM	0,05	ml	KCl 1500 mM
ADP	2 mM	0,05	ml	ADP 40 mM, c = 20
3-PGS	7 mM	0,05	ml	3-PG-C 140 mM, c = 75
2,3-di-PGS	0,5 mM	0,10	ml	2,3-di-PGS 5mM, c = 4,5 jedesmal frisch ansetzen
ENO	40 BE/ml	0,02	ml	ENO c = 10, 1 : 8
PK	60 BE/ml	0,005	ml	PK c = 2 unverdünnt
LDH	120 BE/ml	0,012	ml	LDH c = 5 1 : 10
Wasser	ad	0,98	ml	
Extrakt		0,02	ml	Hornhautepithel

Schreibskala 0 - 1,0 ; d = 2

Pyruvatkinase PK

TRAP	50	mM	0,5	ml TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM		pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02	ml DPNH 11 mM, c = 8
KCL	75	mM	0,05	ml KCL 1500 mM
Mg ⁺⁺	8	mM	0,05	ml MgCl ₂ 160 mM
ADP	2	mM	0,05	ml ADP 40 mM, c = 20
LDH	40 BE/ml		0,004	LDH c = 5, 1 : 10
Extrakt			0,02	ml Hornhautepithel
Wasser		ad	0,99	ml
PEP	1	mM	0,01	ml PEP-C 100 mM, c = 46,6

Schreibskala 0 - 1,0 ; d = 2

Da alkalische Phosphatase aus PEP Phosphat abspaltet, müssen Kontrolltests ohne ADP erfolgen.

Fructose - 6 - Phosphatkinase

F - 6 - PK

TRAP	50	mM	0,5	ml TRAP	100 mM mit 10 mM EDTA	
EDTA	5	mM			pH 7,6	
MgSO ₄	8	mM	0,05	ml MgCl ₂	160 mM	
DPNH	0,22	mM	0,02	ml DPNH	c = 8	
ATP	1,5	mM	0,02	ml ATP	c = 45,5	
F-6-PK	1,6	mM			nach der jeweils bestimmten Konzen-	
					tration des Präparates	
ALD	40	BE/ml	0,01	ml ALD	c = 10	1 : 2
TIM	80	BE/ml	0,01	ml TIM	c = 10	1 : 20
GDH	120	BE/ml	0,02	ml GDH		1 : 3
Wasser				ad 1,0 ml		
Extrakt			0,02	ml Hornhautepithel		

Schreibskala 0 - 0,25 ; d = 2

Glutamat-Dehydrogenase - G L D H

TRAP	50	mM	0,5	ml TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM		pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02	ml DPNH 11 mM, c = 8
(NH ₄) ₂ SO ₄	40	mM	0,05	ml (NH ₄) ₂ SO ₄ 800 mM
Extrakt			0,03 - 0,05	ml Hornhautepithel
			ad	0,98 ml

ΔKG 3 mM 0,02 ml ΔKG 150mM, c = 22

Schreibskala 0 - 0,250, d = 2

Extinktionsänderung vor Zusatz von ΔKG ist auf mitochondriale DPNH-Oxydase zurückzuführen.

Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase A L D

TRAP	50	mM	0,5	ml TRAP 100 mM mit 10 mM EDTA
EDTA	5	mM		pH 7,6
DPNH	0,22	mM	0,02	ml DPNH 11 mM, c = 8
FDP	4	mM	0,02	ml FDP-C 200 mM, c = 183
GDH	60	BE/ml	0,01	ml GDH 1 : 3
TIM	40	BE/ml	0,01	ml TIM 1 : 20
Wasser		ad	0,98	ml

Extrakt 0,02 ml Hornhautepithel

Schreibskala 0 - 0,500 ; d = 2

M E T H O D I S C H E R A N H A N G

Horn- haut Nr.	LDH	GDH	TIM	GAPDH	PGK	GPM	PK	F-6-PK	ALD
1	610	-	-	-	-	-	-	-	5,08
2	897	-	-	192	349	-	-	-	5,3
3	447	-	-	120	181	-	-	-	5,5
4	445	-	-	78	118	95	35	-	4,5
5	502	-	-	107	226	92	45	-	4,4
6	502	-	-	93	120	81	61,5	-	4,6
7	511	0,6	348	100	61	91	88	8	4,6
8	405	0,6	275	116	144	74	85	7,7	5,1
9	445	-	-	101	-	-	-	-	3,8
10	382	-	-	87	-	-	-	-	3,25
11	495	-	-	180	-	-	-	-	7
12	421	-	-	97	-	-	-	-	3,03
13	480	-	-	-	-	-	-	-	-
14	320	-	-	-	-	-	-	-	-
15	427	-	-	80	-	-	-	-	5,5
16	535	-	-	76	-	-	-	-	5,4
17	590	0,3	390	66	96	115	85	7,9	4,67
18	425	0,3	386	60	85	120	84	12	6,06

Tabelle 16

Einzelwerte der Enzymaktivitäten im Epithel der Schweinehornhaut
in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht / Min.)

Horn- haut Nr.	LDH	GDH	TIM	GAPDH	PGK	GPM	PK	GLDH	F-6-PK	ALD
1	96	-	-	58	132	86,5	18	-	-	4,4
2	186	0,29	-	38	81	60,3	59	-	-	2,4
3	150	-	-	38	90	55	40	0,15	-	2,5
4	150	0,13	-	39	75	-	-	-	0,5	2,0
5	225	0,32	-	48,5	60	15	-	0,16	-	2,8
6	263	0,25	-	37	81	55	15,4	0,16	2,3	2,1
7	192	-	510	32	72	40,5	11,4	-	1,4	2,16
8	130	-	325	49	-	60	4,25	-	3,3	3,3
9	83	-	358	34	93	8,6	-	0,058	1,34	2,3
10	68	-	158	-	-	47,5	26	0,05	1,18	1,95
11	141	-	-	-	-	22	7,6	0,06	0,4	1,41
12	278	-	310	41	108	45	23	0,16	1,8	2,5
13	128	-	205	26,2	52,5	32	25	0,067	1,35	2,6

Tabelle 17

Einzelwerte der Enzymaktivitäten im Endothel der Schweinehornhaut
in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht / Min.)

Horn- haut Nr.	LDH	GDH	GAPDH	PGK	GPM	PK	F-6-PK	ALD
----------------------	-----	-----	-------	-----	-----	----	--------	-----

1	4283	1,34	540	134	-	-	-	5,6
2	3100	3,15	277	140	35,6	-	5,6	3,15
3	3750	1,72	415	181	63,5	24	6	3,26
4	4300	-	-	-	-	42,5	-	5,15
5	3570	1,24	428	99	-	41	-	3,33
6	2260	-	385	82	50	34	-	3,1

Tabelle 18

Einzelwerte der Enzymaktivitäten im Epithel der Kaninchenhornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht / Min.)

Horn- haut Nr.	LDH	GDH	TIM	GAPDH	PGK	GPM	PK	F-6-PK	ALD	GLDH
----------------------	-----	-----	-----	-------	-----	-----	----	--------	-----	------

1	31,5	0,34	-	-	56	25	-	-	4,5	0,15
2	46	0,39	224	40,8	86,5	17,9	3,5	2,3	1,7	0,12

Tabelle 19

Einzelwerte der Enzymaktivitäten im Endothel der Kaninchenhornhaut in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht / Min.)

Horn- haut Nr.	LDH	GDH	TIM	GAPDH	PGK	GPM	PK	HK	ALD	GLDH
1	410	1,97	-	296	-	-	-	-	16,4	1,64
2	96	0,8	770	128	58,7	-	-	-	1,77	-
3	282	-	-	162	190	-	302	-	3,48	-
4	460	-	-	263	66	-	300	-	8,2	-
5	465	-	-	75	41	126	270	-	6,4	-
6	328	-	-	180	27	-	210	-	1,2	-
7	232	-	-	145	116	45	160	-	6,5	-
8	-	-	339	130	-	-	-	-	-	-
9	197	1,4	-	178	95,7	68,2	136	1,8	7	-
10	160	0,56	510	197	96,1	124	170	5,38	9,5	-
11	241	1,2	126	175	-	-	234	3,8	8,4	-

Tabelle 20

Einzelwerte der Enzymaktivitäten im Epithel der Menschenhornhaut
in internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol/g}$ feucht / Min.)

Herrn Prof. Dr. W. Straub danke ich, daß
ich an seiner Klinik arbeiten durfte.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Doz.
Dr. Reim verpflichtet.

Der biologisch-chemischen Assistentin,
Fräulein H. Siefert, danke ich für ihre
Hilfe bei den Arbeiten im Laboratorium.

Lebenslauf

Am 8. Mai 1942 wurde ich als Tochter des Tierarztes Dr. Rudolf Maier und seiner Ehefrau Elisabeth Maier, geb. Brannau in Marburg / Lahn geboren. Ich besuchte von Ostern 1948 bis Weihnachten 1957 die Freie Waldorfschule in Marburg, danach das Gymnasium für Mädchen in Marburg. Im Februar 1962 bestand ich die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Medizinstudium in Marburg, bestand nach 2 Semestern das Vorphysikum und nach drei weiteren Semestern das Physikum.

Während der Semesterferien habe ich in der Medizinischen Klinik zu Marburg und an dem Kreiskrankenhaus Hoya famuliert.

An dieser Stelle möchte ich meinen verehrten akademischen Lehrern, den Herren Professoren und Dozenten danken :

Philipps-Universität Marburg:

Becker, Beckmann, Berendes, Bommer, Buchholz,
Bücher, Dimroth, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk,
Hamm, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt,
Hohorst, Jacob, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr,
Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes,
Maurath, du Mesnil de Rochemont, Neubauer,
Niessing, Petry, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid,
Schwaiger, Seidel, Siegert, Spiegelberg, Staib,
Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle.

